

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И АНАЛИЗ ЯИЧНОГО ЛЕЦИТИНА ХИМИЧЕСКИМИ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Арчинова Т. Ю., Манджиголадзе Т. Ю.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск, Россия (357532, Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: mandjigoladze.tanya@yandex.ru

Изучен состав лецитина очищенного из яичных желтков. Результаты идентификации лецитина методом ТСХ показали наличие в нем фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, лизофосфатидилхолина. Кроме метода ТСХ для идентификации фосфолипидов использовали химические реакции гидролиза, окисления, соле- и комплексообразования, присоединения, осаждения на функциональные группы, такие как: четвертичное аммониевое основание, сложноэфирную группу, остаток глицерина, жирные кислоты (после гидролиза), остаток фосфорной кислоты. Нами были установлены некоторые физические константы: йодное число, кислотное число, рН, потеря в массе при высушивании, зольный остаток, тяжелые металлы, плотность с использованием фармакопейных методов. Предварительные исследования показали, что оптимальным методом количественного определения фосфолипидов в полученном яичном лецитине является гравиметрия. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемый лецитин по количественному содержанию фосфора (3,8 %) соответствует требованиям ФС, которого должно быть не менее 3,5 %. Валидационная оценка методики количественного гравиметрического определения фосфора в яичном лецитине по критериям «Прецизионность», «Сходимость», «Число параллельных определений» показала ее пригодность для аналитических целей.

Ключевые слова: яичный лецитин, фосфолипиды, гравиметрия, ТСХ, валидационная оценка.

THE STUDY OF THE COMPOSITION AND ANALYSIS EGG LECITHIN CHEMICAL AND PHYSICO-CHEMICAL METHODS

Archinova T. Y., Mandzhigoladze T. Y.

Pyatigorskmedico-pharmaceutical Institute – branch GBOU VPO VolgGMU Russian Ministry of Health, Mr. Pyatigorsk, Russia (357532, Pyatigorsk, etc. Kalinina, 11), e-mail: mandjigoladze.tanya@yandex.ru

Studied composition lecithin purified from egg yolks. The results of the identification of lecithin method of TLC have shown the presence in it of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, lysophosphatidylcholine. In addition to the method of TLC for the identification of phospholipids used chemical reactions of hydrolysis, oxidation, salt - and chelation, of accession, deposited on functional groups such as: quaternary ammoniowoye basis, difficult-TV group, the balance of glycerol and fatty acids (after hydrolysis), the balance of phosphoric acid. We have installed some physical constants: iodine number, acid number, pH, the loss in mass drying, ash, heavy metals, the density of using pharmacopoeial methods. Preliminary researches have shown, the optimum method of quantitative determination of phospholipids in the egg lecithin is gravimetry. The obtained results testify to the fact, what analyzed lecithin by the quantitative content of phosphorus (3,8%) complies with the requirements of the FS, which should be no less than 3,5%. Validating assessment of methods for quantitative gravimetric determination of phosphorus in the egg lecithin by criteria «Precision», «Convergence», «The number of parallel definitions» has demonstrated its suitability for analytical purposes.

Key words: egg lecithin, phospholipids, gravimetry, TLC, validating assessment.

Введение

Актуальной проблемой современной медицины является лечение и профилактика заболеваний печени. Строительным материалом клеток органа служат фосфолипиды, которые обладают гепатопротекторным эффектом, одновременно являясь детоксикантами и антицирротическими факторами [2].

Фосфатидилхолин, известный так же, как лецитин, является наиболее важным питательным веществом для поддержания активного состояния печени, а также

универсальным строительным блоком для клеточных мембран и обладает антисклеротическим, нейропротекторным и гиполипидемическим действием, предотвращает образование желчных камней. Фосфолипиды, содержащиеся в лецитине, способствуют поддержанию гомеостаза липидов в организме человека, а также препятствуют замещению печеночных клеток на холестазу [5].

Цель исследования

Известно, что лецитин в достаточных количествах содержится в клетках куриных яиц, поэтому целью настоящих исследований явилось изучение состава лецитина очищенного из яичных желтков, а также разработка оптимальных методик идентификации и количественного определения фосфолипидов, входящих в состав лецитина.

Материал и методы исследования

Объектом исследования является яичный лецитин, полученный на кафедре органической химии профессором Э. Т. Оганесяном и к. ф. н. М. М. Магоновым по модифицированной методике, отличающейся от прототипа тем, что в нем, во-первых, исключено применение солей кадмия; во-вторых, экстракция проводится индивидуальными малотоксичными растворителями (этиловый спирт, ацетон); технологическая схема реализуется на стандартном оборудовании с учетом требований к качеству, регламентируемому соответствующими НД [3].

Методы: химические (качественные реакции), гравиметрия, физико-химические (ТСХ).

Результаты исследования и их обсуждение

Суть методики получения лецитина из яичных желтков заключается в предварительной экстракции лецитина при низких температурах (-18–20 °С) ацетоном. Полученный экстракт подвергают многократной очистке поочередно этанолом и ацетоном. После удаления растворителей и упаривания готовый продукт представляет собой однородную массу плотной гелеобразной консистенции желтого цвета, легко растворимую в этаноле, хлороформе, умеренно – в жирных маслах и практически нерастворимую в воде очищенной и ацетоне.

Полученный лецитин неустойчив к воздействию света и высокой температуры.

С целью изучения состава полученного лецитина использовали метод ТСХ. Предварительно был проведен поиск оптимальной системы растворителей (подвижной фазы). Оказалось, что из 20 систем наиболее приемлемыми явились:

- I) хлороформ – метанол (39:15);
- II) хлороформ – этанол (39:15);
- III) n-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:5);
- IV) хлороформ – ацетон – метанол – ледяная уксусная кислота – вода (5:2:1:1:0,2).

Разделение предполагаемых фосфолипидов в лецитине проводили на пластинках марки «Сорбфил – УФ-254», нанося на линию старта 0,05 мкл 1 % хлороформного раствора изучаемого образца. При проявлении в парах йода проявляются семь пятен.

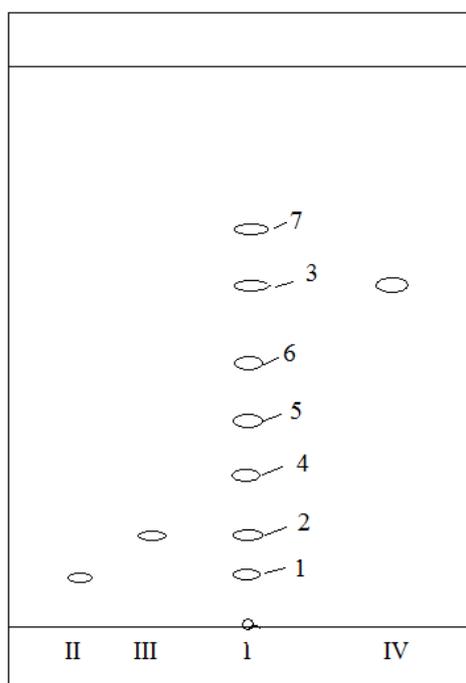
Результаты идентификации лецитина методом ТСХ представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Результаты идентификации лецитина методом ТСХ
(проявитель – пары йода)**

№ п/п	Обнаруженное вещество	Значение Rf			
		Системы растворителей			
		I	II	III	IV
1	Фосфатидилхолин	0,15	0,07	0,34	0,39
2	Фосфатидилэтаноламин	0,30	0,18	0,27	0,35
3	Лизофосфатидилхолин	0,80	0,83	0,89	0,64
4	Вещество «4»	0,25	0,28	0,36	0,42
5	Вещество «5»	0,28	0,45	0,48	0,53
6	Вещество «6»	0,51	0,63	0,52	0,61
7	Вещество «7»	0,71	0,98	0,74	0,78

Три пятна были идентифицированы, остальные («4»-«7») – нет, из-за отсутствия свидетелей.

Более четкого разделения веществ удалось добиться при использовании системы растворителей: хлороформ-этанол (39:5) (рис. 1).



**Рисунок 1. Хроматограмма лецитина в системе растворителей:
хлороформ-этанол (39:5)**

Свидетели: II – Фосфатидилхолин

III – Фосфатидилэтаноламин

IV – Лизофосфатидилхолин

Полученные результаты позволяют предположить, что оптимальной подвижной фазой является система II, а также согласуются с литературными данными [4].

Кроме метода ТСХ для подтверждения подлинности фосфолипидов лецитина использовали химические реакции на функциональные группы и структурные элементы. Для анализа брали 5 % спиртовой раствор исследуемого лецитина.

Третичный амин и четвертичное аммониевое основание обнаруживали по появлению осадков после добавления раствора кадмия хлорида.

Сложноэфирную группу идентифицировали с помощью реакции образования гидроксамата железа (III) (красно-бурый осадок).

Остаток глицерина после щелочного гидролиза фосфолипидов и удаления выпавших в осадок жирных кислот из кислой среды обнаруживали с помощью реакции образования комплексной медной соли в аммиачной среде (синее окрашивание).

Остаток кислоты фосфорной после гидролиза идентифицировали реакцией взаимодействия саммония молибдатом в азотнокислой среде (желтый осадок).

Наличие холина подтверждали при нагревании гидролизата. Ощущался характерный запах триметиламина, который окрашивал смоченную водой очищенной красную лакмусовую бумагу в синий цвет.

Продукты окисления лецитина идентифицировали с помощью реактива Марки; на границе двух слоев жидкости появлялось красное окрашивание.

Сумму фосфолипидов также идентифицировали по стойкой водной эмульсии, а фосфатидилхолин – с помощью реакции осаждения ацетоном.

Кроме того, были установлены некоторые физические константы (табл. 2) с использованием фармакопейных методов для установления доброкачественности полученного лецитина [1].

Таблица 2. Некоторые числовые показатели яичного лецитина

№ п/п	Числовые показатели	Результаты
1	Йодное число	64,85±0,48
2	Кислотное число	22,48±0,71
3	pH (потенциометрически)	6,24±0,12
4	Потеря в массе при высушивании	2,8%
5	Зольный остаток	3,6%
6	Тяжелые металлы	менее 0,001%
7	Плотность	1,332±0,014

Результаты, представленные в таблице 2, соответствуют требованиям ФС [6].

Предварительные исследования по поиску оптимального метода количественного определения лецитина с использованием титриметрических методов (неводное титрование, аргентометрия, нейтрализация в спиртовой среде) не дает достоверных и воспроизводимых результатов. Это объясняется тем, что лецитин – это комплекс фосфолипидов, и рассчитать правильный титр не представляется возможным. Поэтому оптимальным методом количественного определения фосфолипидов в полученном яичном лецитине является гравиметрия, основанная на минерализации лецитина до магния пиррофосфата.

Методика. Около 1 г лецитина (точная навеска) помещают в колбу для определения азота вместимостью 500 мл, прибавляют 20 мл кислоты серной концентрированной и 3 мл кислоты азотной концентрированной. Смесь осторожно нагревают на сетке, на небольшом пламени до обесцвечивания раствора; для ускорения сгорания органического вещества к охлажденной смеси дополнительно прибавляют несколько раз малыми порциями кислоту азотную.

Остывший бесцветный раствор переносят в стакан, нейтрализуют концентрированным раствором аммиака (по метиловому красному), прибавляют несколько капель кислоты хлористоводородной, разведенной до кислой реакции, 10мл раствора аммония хлорида и нагревают раствор до 60 °С. К теплomu раствору прибавляют 25 мл раствора смеси, состоящей из магния сульфата, аммония гидроксида, аммония хлорида и при постоянном помешивании 2,5 % раствора аммиака. Через 30 минут добавляют 20 мл концентрированного раствора аммиака и оставляют до полного осаждения. Через 12 часов смесь фильтруют через беззольный фильтр, осадок на фильтре промывают 8–10 раз 2,5 % раствором аммиака, фильтр осторожно сжигают, остаток прокаливают и взвешивают. Опыт повторяют трижды.

Содержание фосфора (X) в % рассчитывают по формуле:

$$X_{\%} = a \cdot 100\% \cdot 0,2783, \quad (1)$$

где а – остаток после прокаливания (магния пиррофосфат), г;

0,2783 – коэффициент пересчета на фосфор.

Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты количественного определения фосфора в лецитине гравиметрическим методом

Навеска (г)	Найдено магния пиррофосфата (г)	Найдено фосфора (г)	Метрологические характеристики
1,0035	0,1383	0,0385	$\bar{X}_2=0,038;$ $\bar{x}_{\%}=3,8\%$ $S^2=0,00185;$ $SD=0,043$ $RSD=0,045$
1,0009	0,1373	0,0382	
1,0021	0,1365	0,0380	
0,9982	0,1355	0,0377	

1,0012	0,1368	0,0381	$S\bar{x}=0,16;$ $t=2,45$ $\Delta x=0,4$ $\varepsilon_{\alpha}=\pm 1,1\%$
1,0027	0,1377	0,0383	
0,9945	0,1338	0,0372	

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемый лецитин по количественному содержанию фосфора соответствует требованиям ФС, которого должно быть не менее 3,5 %.

С целью установления пригодности для аналитических целей разработанной методики гравиметрического определения фосфолипидов в яичном лецитине была проведена ее валидационная оценка по критериям: «Прецизионность», «Сходимость результатов определений» (статистика однородности выборки), «Число параллельных определений».

Фактор сходимости результатов двух параллельных определений $L(P, n)$ при $P=95\%$ и $n=2$, равен 2,77. В случае сходимости должно реализовываться неравенство:

$$|\bar{X} - X_{max}| < L \cdot S, \quad (2)$$

где L – фактор, используемый при оценке сходимости результатов параллельных определений;

S – стандартное отклонение;

тогда:

$$L \cdot S = 2,77 \cdot 0,026 = 0,07$$

$$a) |8,82 - 8,85| = 0,03$$

$$б) |8,82 - 8,8| = 0,02$$

Как видно из результатов $0,03 < 0,07$ и $0,02 < 0,07$.

Таким образом, результаты сходимы.

Число параллельных определений рассчитывается по формуле:

$$m = \frac{\Delta X \cdot 100}{\varepsilon_{\alpha} \cdot \bar{X}}, \quad (3)$$

где ΔX – полуширина доверительного интервала величины;

ε_{α} – относительная ошибка результата отдельного определения;

\bar{x} – среднее значение в %, равное 3,82 %.

$$m = \frac{0,05 \cdot 100}{1,3 \cdot 3,82} = 1,00$$

Достаточно одного определения, так как ошибка при гравиметрическом определении (φ) равна 1 %.

Полученные результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты валидационной оценки количественного гравиметрического определения фосфора в лецитине очищенном

Определяемый критерий	Полученные результаты	Требования ГФ XII
Прецизионность, SD	1,14%	не более 2,8%
Сходимость результатов двух определений	0,05 0,08	0,12
Число параллельных определений	1	–

Валидационная оценка методики количественного гравиметрического определения фосфора в яичном лецитине по критериям «Прецизионность», «Сходимость результатов определений», «Число параллельных определений» показала ее пригодность для аналитических целей.

Выводы

1. Изучен состав полученного лецитина с помощью метода ТСХ. Обнаружены: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и лизофосфатидилхолин.
2. Разработаны методики идентификации входящих в лецитин фосфолипидов по функциональным группам.
3. Проведено количественное определение фосфолипидов по содержанию фосфора гравиметрическим методом.
4. С помощью валидационной оценки подтверждена пригодность методики количественного определения фосфора в яичном лецитине для аналитических целей.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 12-е изд. – М.: «Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – Ч. 1, 2.
2. Манджиголадзе Т. Ю., Арчинова Т. Ю. Изучение гепатопротекторного действия лецитина и сиропа с лецитином // Актуальные проблемы науки фармац. и мед. вузов: от разработки до коммерциализации: материалы науч. практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 75-летию Пермской ГФА 7–9 дек. 2011 г. – Пермь, 2011. – С.115-118.
3. Патент РФ 2002100678 / 13, 03.01.2002.
Оганесян Э. Т., Мальцев Ю. А., Магонов М. М., Воробьев Н. Ю. Способ получения яичного лецитина // Патент России № 2255559.2002.
4. Прохорова Л. В., Шемстова В. В., Антонова Н. П. Применение хроматографических методов (ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ) в анализе фосфолипидов (обзор) // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы съезда 22–25 июня 2005 г. – СПб., 2005. – С. 549-556.

5. Скатков С. А. Влияние фосфолипидов на фертильность // Проблемы репродукции. – 2002. – № 3. – С. 20-25.
6. ФС 42-2119-91. «Лецитин очищенный». – 6 с.

Рецензенты:

Лазарян Джон Седракович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ, г. Пятигорск.

Попова Ольга Ивановна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ, г. Пятигорск.